

PCT/JP 00/01353

06.03.00

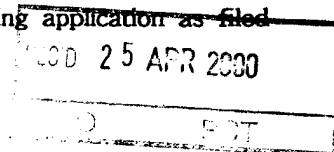
日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP 00/01353

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.



出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年12月 6日

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第346288号

出 願 人
Applicant (s):

三菱レイヨン株式会社

EKU

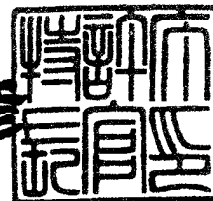
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3023387

特平 1 1 - 3 4 6 2 8 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 P110682000

【提出日】 平成11年12月 6日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/11

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 1 0 番 1 号 三菱レイヨン
 株式会社化成品開発研究所内

 【氏名】 湯 不二夫

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 1 0 番 1 号 三菱レイヨン
 株式会社化成品開発研究所内

 【氏名】 渡辺 文昭

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 1 0 番 1 号 三菱レイヨン
 株式会社化成品開発研究所内

 【氏名】 森下 岳晴

【特許出願人】

 【識別番号】 000006035

 【氏名又は名称】 三菱レイヨン株式会社

 【代表者】 田口 栄一

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 010054

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体高分子チップのハイブリダイゼーション法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プローブを含む含有物のハイブリダイゼーション法において、検体が自然拡散以外の方法により該含有物中を拡散することにより、プローブとハイブリッド形成し、且つプローブと未結合の検体が該含有物系外に除去されることを特徴とするプローブを含む含有物のハイブリダイゼーション法。

【請求項 2】 プローブを含む含有物が、担体に生体高分子プローブを結合せしめたものである請求項 1 記載のプローブを含む含有物のハイブリダイゼーション法。

【請求項 3】 担体が水溶性高分子ゲルである請求項 2 記載のプローブを含む含有物のハイブリダイゼーション法。

【請求項 4】 水溶性高分子がアクリルアミドである請求項 3 記載のプローブを含む含有物のハイブリダイゼーション法。

【請求項 5】 生体高分子が核酸である請求項 2～4 いずれか 1 項に記載のプローブを含む含有物のハイブリダイゼーション法。

【請求項 6】 検体が蛍光ラベルされていることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のプローブを含む含有物のハイブリダイゼーション法。

【請求項 7】 自然拡散以外の方法が、電圧によるものである請求項 1～6 いずれか 1 項に記載のプローブを含む含有物のハイブリダイゼーション法。

【請求項 8】 自然拡散以外の移動方法が、吸水性物質によるものである請求項 1～7 いずれか 1 項に記載のプローブを含む含有物のハイブリダイゼーション法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プローブ含有物のハイブリダイゼーション法に関する。詳しくは、担体に生体高分子プローブが結合している生体高分子支持体（以下、生体高分子チップ）のハイブリダイゼーション法において、検体を自然拡散以外の方法によ

り生体高分子チップ中に拡散せしめてハイブリッドを形成させ、さらには生体高分子プローブと未結合の検体を該チップ系外へすみやかに除去することを特徴とする生体高分子チップ検出法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができるが、その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸-核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種のPCR反応を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。しかしながら、これらの方法では適用し得る遺伝子の数に制限がある。したがって、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一単位レベルという極めて多数の遺伝子から構成される複雑な反応系全体からみると、上記方法により遺伝子の総合的・系統的解析を行うことは困難である。

【0003】

最近になって、多数遺伝子の一括発現解析を可能とするDNAマイクロアレイ法（DNAチップ法）と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発され、注目を集めている。これらの方法は、いずれも核酸-核酸間ハイブリダイゼーション反応に基づく核酸検出・定量法である点で原理的には従来の方法と同じであるが、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基盤片上に、多数のDNA断片が高密度に整列固定化されたものが用いられている点に大きな特徴がある。マイクロアレイ法の具体的使用方法としては、例えば、研究対象細胞の発現遺伝子等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基盤片上でハイブリダイゼーションさせ、互いに相補的な核酸（DNA又はRNA）同士を結合させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速に読みとる方法が挙げられる。こうして、サンプル中のそれぞれの遺伝子量を迅速に推定できる。この新しい方法の導入によ

り、反応検体の微量化と、その反応検体を再現性よく多量・迅速・系統的に分析、定量することが可能となってきた。

【0004】

本発明者らの一部は、先に新規なマイクロアレイの製造法を開発、出願している。(特願平 11-84100 号) 該発明は、核酸固定化ゲルをその中に保持する核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体を作製し、配列体の繊維軸と交差する方向に切断することにより薄片を得るものである。この薄片は固定化核酸二次元高密度配列体、すなわちマイクロアレイである。

一方、ゲル中にプローブ核酸を固定化し、検体中の核酸とのハイブリダイゼーションを検出する試みがなされている。(特開平 3-47097 号、WO 98/51823)

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、現在使用されているマイクロアレイを用い、遺伝子解析を行う際、ハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション後の洗浄操作に、長時間を要する。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、本発明者らの一部が提案している多孔質中空繊維内部に核酸固定化ゲルが保持された核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体(特願平 11-84100 号) すなわち DNA チップにおいて、検体 DNA を強制的にプローブ DNA 近傍まで移動させることにより、短時間でハイブリダイゼーションを行わせ、さらにはハイブリダイゼーションが起らなかった検体 DNA をチップ中からすみやかに除去できることを見だし本発明を完成させるに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、プローブ含有物、特に生体高分子チップのハイブリダイゼーション法において、自然拡散以外の方法により検体を該チップ中に移動せしめてハイブリッド形成させ、且つ生体高分子チップとハイブリット形成しなかつ

た検体を該チップ中からすみやかに除去することを特徴とする生体高分子チップのハイブリダイゼーション法に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下本発明を詳細に説明する。

本発明におけるプローブ含有物の種類、形態は、本発明の方法が適用されるものであれば特に制限されるものではない。本発明における生体高分子プローブとは、例えば、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ペプチド核酸、タンパク質（酵素、抗体等）、抗原、多糖類等が挙げられる。

検体とプローブとのハイブリダイゼーションを行う際、生体高分子チップの両面に電圧をかける場合には、例えば、サブマリン型泳動槽（図1）又はプロッティング装置（図2）等を使用することが可能である。装置はこれらに限定されるものではない。検体は、濾紙やメンブレンに吸着させたり、アクリルアミドやアガロースのような高分子ポリマーに包括させ、生体高分子チップに密着させる。次に電圧を一定時間かけた後、ハイブリダイズした場所を検出器で特定する。また、生体高分子チップの片面に吸水性物質を配置することにより、対面に配置した検体をチップ中に移動させ結合反応を行う際、該吸水性物質はスポンジ、紙等を用いることができる。

【0009】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

実施例 1

(1) 染色体DNAの調製

ロドコッカス ロドクロウス J-1 (FERM BP-1478) を栄養培地（グルコース 15 g、酵母エキス 1 g、グルタミン酸ナトリウム 10 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L pH 7.2）100 ml で 30℃、3 日培養し、集菌した。該菌体から染色体DNAを調製し、PCRの鋳型に用いた。

【0010】

(2) プローブの作製

プローブ作製のために合成したオリゴヌクレオチドの位置を、図3に示した。オリゴヌクレオチドA（配列番号1）はオリゴヌクレオチドB（配列番号2）の約400塩基上流に位置しており、オリゴヌクレオチドE（配列番号3）はオリゴヌクレオチドAから400base、オリゴヌクレオチドF（配列番号4）はオリゴヌクレオチドBから600base下流に位置している。PCRには、オリゴヌクレオチドA及びBの5'末端をアクリルアミド修飾したオリゴヌクレオチドヌクレオチド（和光純薬へ委託合成）を使用した。PCRは、一方のプライマーを過剰量存在させるAsymmetric PCRを行った。プライマー濃度は、5'アクリルアミド修飾オリゴヌクレオチドA-オリゴヌクレオチドE（100:1）又は5'アクリルアミド修飾オリゴヌクレオチドB-オリゴヌクレオチドF（100:1）に調製した。他の条件は、Ex-Taq（宝酒造株式会社製）の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALを用いて行った。反応は100 μ lで行い、温度条件は93 $^{\circ}$ C 30秒、65 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 2分を40サイクル行った。このPCRによって約400塩基（プローブG：配列番号5）及び600塩基（プローブH：配列番号6）の5'アクリルアミド修飾されたプローブDNAを増幅した。

【0011】

(3) 核酸固定化薄片の作製

以下の組成からなる水溶液A（アクリルアミド 3.7質量部、メチレンビスアクリルアミド 0.3質量部、2, 2'-アゾビス（2-アミジノプロパン）2塩酸塩 0.1質量部、プローブG又はプローブH 0.005質量部）を調製した。この水溶液Aに無孔質な中間層を有するポリエチレン製多孔質中空糸膜MHF200TL（三菱レイヨン株式会社製、外径290 μ m、内径200 μ m）を浸した後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80 $^{\circ}$ Cで4時間放置することにより重合反応を行った。

【0012】

得られた多孔質中空糸膜の内側の多孔質層には、中空部及び無孔質な中間層よ

りもプローブG又はHが固定化されたゲルが保持されていた。該方法で得られたプローブG固定化ゲルを保持する多孔質中空繊維5本を、フロン板上に重なることなく密着させて配列し両端を固定した。これにポリウレタン樹脂接着剤（日本ポリウレタン工業株式会社 コロネート4403、ニッポラン4223）を薄く塗布し、核酸固定化多孔質中空繊維を接着した。ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、テフロン板上から剥がし、核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維が一行に配列したシート状物を得た。プローブHについても同様に核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維が一行に配列したシート状物を得た。また、ブランクとして、核酸を固定化していない同様のシート状物を作製した。

【0013】

次いで、これらのシート状物をブランク、プローブG、ブランク、プローブH、ブランクの順に5枚積層し、上記接着剤で接着し、縦横各々5本ずつ、計25本の核酸固定化多孔質繊維が正方に規則的に配列した核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維配列体を得た。こうして得られた核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維配列体を、ミクロトームを用いて0.1mmの厚さに切り出し、縦横各20本ずつ計400本の核酸固定化ゲルを保持した多孔質中空繊維の断面が規則的に配列した薄片を得た。

【0014】

(4) 蛍光標識検体の作製

検体核酸のモデルとして以下のような検体DNAを作製し、ハイブリダイゼーションに用いた。プローブGのみにハイブリダイズする検体の作製には、オリゴヌクレオチドEとオリゴヌクレオチドAを用いてPCRを行い、約400塩基の検体I（配列番号7）を調製した。プローブHのみにハイブリダイズする検体の作製には、オリゴヌクレオチドFとオリゴヌクレオチドBを用いてPCRを行い、約600塩基の検体J（配列番号8）を調製した。

【0015】

検体を蛍光標識するために、オリゴヌクレオチドヌクレオチドE及びFの5'末端がCy5でラベルされたもの（Cy5-オリゴヌクレオチドE、Cy5-オリゴヌクレオチドF）を合成（アマシャムファルマシアバイオテック社、O l i d

oExpress) し、PCRに使用した。PCRは、プライマー濃度をCy5-オリゴヌクレオチドヌクレオチドE-オリゴヌクレオチドA (100:1)又はCy5-オリゴヌクレオチドヌクレオチドF-オリゴヌクレオチドB (100:1)に調製し、その他はEx-Taq (宝酒造株式会社製)の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALを用いて行った。反応は100 μ lで行い、温度条件は93℃ 30秒、65℃ 30秒、72℃ 2分を40サイクル行った。このPCRによって検体I及び検体JのDNAを増幅した。反応終了液はSUPEC-02 (宝酒造)を用いて未反応プライマーを除き、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (アマシャムファルマシアバイオテク)によって回収した。

【0016】

(5) ハイブリダイゼーション

回収した蛍光標識検体2 μ lを濾紙 (PhastTransfer Filter Paper: アマシャムファルマシアバイオテク) にスポットし、実施例1(3)で得られたDNA固定化薄片の片側に密着させ、図1で示した装置を用いて5V、2時間電圧をかけることにより、ハイブリダイゼーションと洗浄を行い、蛍光検出器 (蛍光顕微鏡) で観察した。

【0017】

その結果、核酸固定化薄片中のプローブGを固定化した多孔質繊維断面部にのみ検体Iが、プローブHを固定化した多孔質繊維断面部にのみ検体Jが特異的にハイブリダイゼーションしていることが確認できた。

【0018】

【発明の効果】

本発明によれば、プローブ含有物のハイブリダイゼーション法において、検体を強制的にプローブの近傍まで移動させることにより短時間にハイブリダイゼーションを行わせ、さらにはハイブリダイゼーションが起こらなかった検体を速やかに除去することができる。

【0019】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Rayon Co., Ltd.

<120> Hybridization method of biopolymer

<130> P110682000

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodochrous

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg ctc

33

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<220>

<213> Rhodococcus rhodochrous

<223> Synthetic DNA

<400> 2

gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc ag

32

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodochrous

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

gctcaagcgc gatttcggtt tcgacatccc c

31

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodochrous

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

catgtcgcgt cgttggtgga cgaagcggt

30

<210> 5

<211> 388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg ctcatcacgc ccgccgcggt cgaccgagtc

60

gtttcgtact acgagaacga gatcggcccg atgggcggtg ccaaggctgt ggccaagtcc

120

tgggtggacc ctgagtaccg caagtggctc gaagaggacg cgacggccgc gatggcgta

180

ttgggctaig ccggtgagca ggcacaccaa atttcggcgg tcttcaacga ctcccaaacg

240

catcacgtgg tgggtgacac tctgtgttcg tgctatccgt ggccggtgct tgggtctccc

300

特平 1 1 - 3 4 6 2 8 8

ccccctggt acaagagcat ggagtaccgg tcccagtggt tagcggaccc tcgtggagtg

360

ctcaagcgcg atttcggttt cgacatcc

388

<210> 6

<211> 611

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc agtccgaaa tccgtacat cgtcatccc

60

gaacggccgg ccggcaccga cggttgggcc gaggaggagc tgacgaagct ggtgagccgg

120

gactcgatga tcggtgtcag taatgcgtc acaccgagg aagtgatcgt atgagtgaag

180

acacactcac tgatcggtc ccggcgactg ggaccgccgc accgccccgc gacaatggcg

240

agcttgtatt caccgagcct tgggaagcaa cggcattcgg ggtcgccatc gcgctttcgg

300

atcagaagtc gtacgaatgg gatttcttcc gacagcgtct cattcactcc atcgctgagg

360

ccaacggttg cgaggcatac tacgagagct ggacaaaggc gtcgaggcc agcgtggctg

420

actcggggct gatcagcgaa gatgagatcc gcgagcgcat ggaatcgatg gccatcatcg

480

actgacatcc cctgtgtctc catctagcag cagtgcgggc gtaccccgac ggtgctgagc

540

cgacggggta cgcccgact tcatcaatga cggtggttcc taatttggct cggtggatac

600

tgatctcgcg g

611

<210> 7

<211> 388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

ggatgtcgaa accgaaatcg cgcttgagca ctccacgagg gtccgctacc actcgggacc

60

ggtactccat gctctgtac caggcgggcg ggagaccaag caccggccac ggatagcacg

120

aacacagagt gcacaccacc acgtgatgagc ttggggagtc gttgaagacc gccgaaattt

180

ggtgtgcctg ctcaccgga tagcccaatg acgccatcgc ggccgtcgcg tcctcttcga

240

gccacttgcg gtactcaggg tccaccagg acttgccac gaccttgca ccgccatcg

300

ggccgatctc gttctcgtag tacgaaacga ctcggtcgac cgcggcgggc gtgatgagcc

360

ctcgctcgta cagcaagggt tcgatcgc

388

<210> 8

<211> 611

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

ccgcgagatc agtatccacc gagccaaatt aggaaccacc gtcattgatg aagtgcgggc

60

gtaccccgtc ggctcagcac cgtcggggta cgcccgcact gctgctagat ggagacacag

120

gggatgtcag tcgatgatgg ccatcgattc catgcgctcg cgatctcat cttcgctgat

180

cagccccgag tcgaccacgc tggcctcgag cgcctttgtc cagctctcgt agtatgcctc

240

gcaaccgttg gcctcagcga tggagtgaat gagacgctgt cggaagaact cccattcgta

300

cgacttctga tccgaaagcg cgatggcgac cccgaatgcc gttgcttccc aaggctcggc

360

gaatacaagc tcgccattgt cgcggggcgg tgcggcggtc ccagtcgccg ggagccgac

420

agtgagtgtg tcttcactca tacgatcact tcctgcggtg tgagcgcatc actgacaccg

480

atcatcgagt cccggctcac cagcttcgtc agtccctcct cggaccaacc gtcggtgccg

540

gccggccgtt ccgggatgac gatgtagcgg atttcggagc tgctgtccca aaccctgacc

600

tccacctcat c

611

【0 0 2 0】

【配列表のフリーテキスト】

配列番号 1 : 合成DNA

配列番号 2 : 合成DNA

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

配列番号 5 : 合成 DNA

配列番号 6 : 合成 DNA

配列番号 7 : 合成 DNA

配列番号 8 : 合成 DNA

【図面の簡単な説明】

【図 1】 サブマリン型泳動槽を示す。

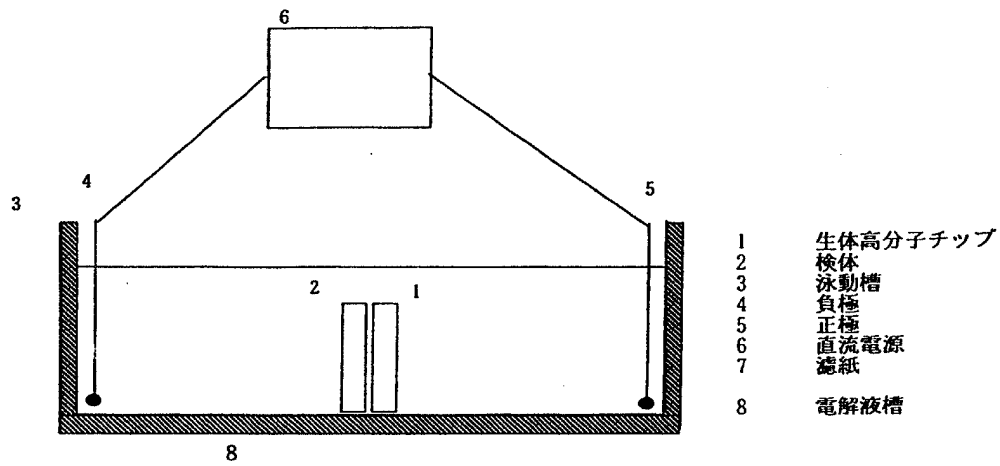
【図 2】 プロテイング装置を示す。

【図 3】 プローブの作製法を示す。

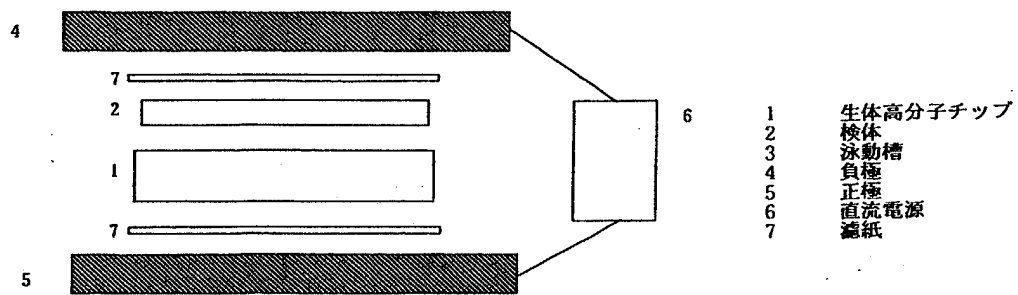
特平 1 1 - 3 4 6 2 8 8

【書類名】 図面

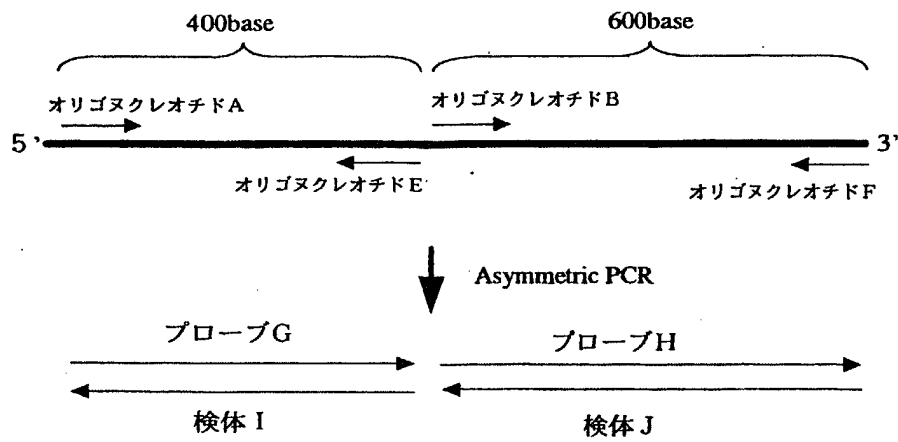
【図 1】



【図 2】



【図 3】



特平 1 1 - 3 4 6 2 8 8

【書類名】要約書

【要約】

【課題】プローブ含有物のハイブリダイゼーション法の提供。

【解決手段】プローブ近傍に強制的に検体を移動、ハイブリットを形成させ、
プローブと未結合の検体をすみやかに系外に除去する。

【選択図】なし

特平11-346288

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006035]

1. 変更年月日	1998年 4月23日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都港区港南一丁目6番41号
氏 名	三菱レイヨン株式会社